

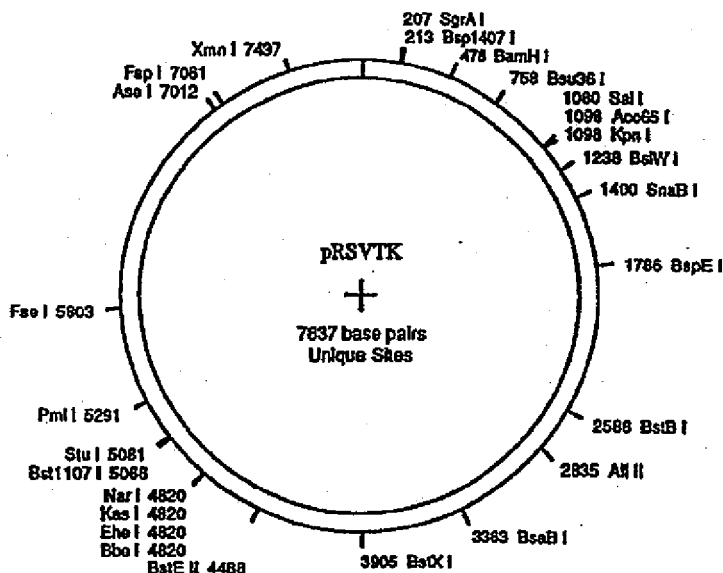


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 15/85, 7/04, A61K 39/235	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/14102 (43) Date de publication internationale: 26 mai 1995 (26.05.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01285 (22) Date de dépôt international: 7 novembre 1994 (07.11.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/13772 18 novembre 1993 (18.11.93) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DEDIEU, Jean-François [FR/FR]; 84, quai de Jemmapes, F-75010 Paris (FR). LE ROUX, Aude [FR/FR]; 4, allée d'Alsace, F-94550 Chevilly-Larue (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 20, résidence du Moulin, F-28150 Ouarville (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LV, MD, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>

(54) Title: RECOMBINANT VIRUSES CODING FOR THYMIDINE KINASE IN GENE THERAPY

(54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LA THYMIDINE KINASE LORS DE THERAPIE GENIQUE



(57) Abstract

The invention concerns recombinant adenoviruses comprising a DNA sequence coding for thymidine kinase under the control of heterologous expression signals preparation thereof, and their use in the treatment and prevention of cancers.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN codant pour la thymidine kinase sous le contrôle de signaux d'expression hétérologues, leur préparation, et leur utilisation pour le traitement et/ou la prévention des cancers.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LA THYMIDINE KINASE LORS DE THERAPIE GENIQUE

La présente invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale et leur utilisation pour le traitement des cancers. Plus particulièrement, elle concerne des
5 adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN codant pour la thymidine kinase sous le contrôle de signaux d'expression hétérologues. L'invention concerne également la préparation de ces vecteurs, les compositions pharmaceutiques les contenant et leur utilisation en thérapie génique.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie
10 (mutation, expression aberrante, etc) par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique peut être introduite soit in vitro dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement in vivo dans le tissu approprié. Différentes techniques ont été décrites pour l'introduction de cette information génétique, parmi
15 lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), d'ADN et de lipides (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), l'emploi de liposomes (Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de
20 gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

De nombreuses applications de la thérapie génique sont en cours d'étude,
25 telles que les maladies génétiques (myopathie, mucoviscidose, SCID, etc), les pathologies du système nerveux central (alzheimer, Parkinson, etc), les maladies cardiovasculaires (hémophilie, athérosclérose), le SIDA ou les cancers.

La présente invention concerne un adénovirus recombinant capable d'induire, en présence d'agents thérapeutiques, la mort sélective des cellules infectées. Les
30 adénovirus de l'invention peuvent être utilisés pour la destruction sélective de cellules cancéreuses, infectées par des virus (HIV, hépatite), etc. Plus particulièrement, elle concerne des adénovirus recombinants comprenant une séquence d'ADN codant pour la thymidine kinase sous le contrôle.

La thymidine kinase du virus de l'herpès simplex est capable de phosphoryler
35 les analogues de nucléosides tels que l'acyclovir et le ganciclovir. Ces molécules

modifiées peuvent être incorporées dans une chaîne d'ADN en cours d'élongation, ce qui a pour conséquence l'arrêt de la synthèse d'ADN, entraînant la mort de la cellule (Nishiyama et al., J. Gen. Virol. 45 (1979) 227; F.L. Moolten, Cancer Res. 46 (1986) 5276). Cette stratégie permet ainsi d'éliminer spécifiquement les cellules exprimant le gène suicide. De plus, la synthèse d'ADN étant la cible de la toxicité, seules les cellules en cours de division sont affectées.

L'utilisation thérapeutique du gène de la thymidine kinase a déjà été envisagée dans l'art antérieur. Ainsi, la demande WO 93/02556 décrit l'utilisation de cellules prélevées dans la tumeur, modifiées génétiquement ex vivo par introduction du gène de la thymidine kinase, puis réadministrées au patient. Toutefois, cette approche impose des étapes de chirurgie, et de plus, la stabilité du gène toxique dans la cellule transformée ex vivo n'est pas démontrée. De même, la demande WO 93/04167 décrit le traitement de certaines tumeurs par implantation au voisinage des tumeurs, de cellules productrices de rétrovirus contenant le gène TK. Les cellules productrices greffées sont sensées produire des rétrovirus capables d'infecter les cellules tumorales et de les sensibiliser au ganciclovir. Toutefois, cette technique implique l'implantation de cellules productrices de rétrovirus, ce qui (1) nécessite une étape de chirurgie lourde et délicate, (2) pose des problèmes d'immunogénicité liés à la présence de ces cellules, (3) pose des problèmes d'effets secondaires liés à d'éventuels produits de sécrétion de ces cellules productrices implantées, et (4) rend très difficile le contrôle de la quantité de particules virales produites par ces cellules après l'implantation.

La présente invention apporte une solution avantageuse à ces problèmes. Elle fournit en effet des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, pour diriger l'expression de la thymidine kinase dans des cellules cibles. La présente invention permet donc d'éviter l'utilisation de cellules productrices dont les nombreux inconvénients ont été mentionnés ci-dessus. Elle permet également de contrôler la quantité de virus administrée et donc de thymidine kinase produite, et offre ainsi un meilleur contrôle du traitement. Par ailleurs, les adénovirus de l'invention présentent l'avantage de ne pas s'intégrer au génome des cellules qu'ils infectent, de s'y maintenir de manière très stable ce qui limite considérablement les risques de diffusion aux cellules voisines, et d'avoir un spectre d'hôte très large, ce qui offre de nombreuses applications thérapeutiques. De plus, des adénovirus recombinants peuvent être obtenus avec des titres élevés, ce qui permet de travailler à des multiplicités d'infection élevées. De plus, l'emploi de signaux d'expression hétérologues permet d'optimiser

pour chaque application thérapeutique, et donc, pour chaque type cellulaire concerné, les niveaux et les conditions d'expression de la thymidine kinase.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour la thymidine kinase sous le
5 contrôle de signaux d'expression hétérologues.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel adénovirus recombinant défectif pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des cancers et/ou des maladies virales.

Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se
10 répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par le gène inséré.
15 Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsulation des particules virales.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Néanmoins, ces virus ne sont pas pathogènes pour l'homme, et notamment les sujets non immuno-déprimés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser
20 dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV).
25 De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple].

De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

30 Comme indiqué ci-dessus, les adénovirus de l'invention portent une séquence d'ADN codant pour la thymidine kinase. Il s'agit de préférence du gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (HSV-tk). Plus préférentiellement encore, on utilise dans le cadre de la présente invention le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex humain (hTK HSV-1). La séquence de ce gène a été décrite dans la
35 littérature (voir notamment McKnight et al., Nucleic Acid. Res. 8 (1980) 5931). Cette

séquence est placée sous le contrôle de signaux d'expression hétérologues permettant son expression dans les cellules infectées. Au sens de la présente invention, on entend par signaux d'expression hétérologues des signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression d'un gène TK. Il peut s'agir en particulier de séquences
5 responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du
10 génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Par ailleurs, lorsque la séquence d'ADN codant pour la thymidine kinase ne comporte pas de séquences d'expression, elle peut être insérée dans le
15 génome du virus déficient en aval d'une telle séquence.

Dans un premier mode particulier de réalisation particulier de l'invention, on utilise de préférence le promoteur RSV, qui permet une expression durable et importante de la thymidine kinase dans les cellules du système nerveux, notamment central.

Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, on utilise des
20 signaux d'expression actifs spécifiquement dans les cellules tumorales. De cette façon, le gène utilisé n'est exprimé et ne produit son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule tumorale. Plus préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression induits par ou actifs en présence de virus responsables ou associés à des tumeurs. Encore plus préférentiellement, on utilise dans le cadre de la présente invention un
25 signal d'expression inductible par le virus d'Epstein-Barr (EBV), ou par le virus du papillome.

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est associé à deux types de cancers humains : le lymphome de Burkitt et le cancer du nasopharynx. L'utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant un gène toxique sous le contrôle d'un promoteur inductible
30 par l'EBV permet avantageusement d'exprimer spécifiquement ce gène toxique dans les cellules tumorales du nasopharynx. Dans les biopsies de cancers du nasopharynx, un seul antigène nucléaire est régulièrement présent, EBNA1, qui est impliqué dans la maintenance du génome viral dans les cellules infectées par l'EBV en phase latente, et qui transactive le promoteur viral BCR2. Un objet particulier de l'invention réside donc
35 dans l'utilisation, pour l'expression spécifique d'un gène dans les cellules de cancers du

nasopharynx, d'une séquence répondant à EBNA1 (EBNA1-RE : EBNA1 "responsive element"). En particulier, l'invention concerne un adénovirus comprenant comme signal d'expression un promoteur chimère comprenant une séquence répondant à EBNA1 fusionnée en amont d'un autre promoteur viral, le promoteur du gène de la terminale protéine 1 (TP1). Les exemples décrits dans la présente demande montrent bien que ce promoteur chimère est inductible par EBNA1.

Les virus du papillome (notamment le virus HPV 16 et 18) sont responsables de 90 % des cancers du cervix chez la femme et ont été identifiés dans des lésions épithéliales pré-cancéreuses (Riou et al., *Lancet* 335 (1990) 117). Le produit du gène E6 conduit à la formation de tumeurs en diminuant fortement la quantité de p53 sauvage, un anti-oncogène, dans les cellules HPV-positives (Wrede et al., *Mol. Carcinog.* 4 (1991) 171). L'utilisation d'un adénovirus recombinant comprenant un gène toxique sous le contrôle d'un promoteur inductible par le HPV (par exemple la protéine E6) permet avantageusement d'exprimer spécifiquement ce gène toxique dans les cellules tumorales correspondantes.

En outre, ces séquences promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc.

Il peut encore s'agir de signaux d'expression inactifs dans les cellules normales et actifs dans les cellules tumorales. En particulier, on peut utiliser dans le cadre de la présente invention le promoteur de l' α -foetoprotéine (Alpert E., dans *Hepatocellular carcinoma*, Okuda & Peters (eds), New York, 1976, 353) ou de l'IGF-II (Sussenbach et al., *Growth Regulation* 2 (1992) 1), qui sont actifs chez l'adulte uniquement dans les hépatocarcinomes.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., *Gene* 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, *EMBO J.* 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN hétérologue. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un

adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596.

5 Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, 10 intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans une tumeur à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition 15 selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans la tumeur à traiter est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés.

Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode 20 d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est 25 déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou 30 la prévention des cancers. Elle est tout particulièrement adaptée au traitement des cancers du nasopharynx, des tumeurs cérébrales (neuroblastomes, glioblastomes, etc) et des hépatocarcinomes.

Concernant les tumeurs cérébrales, les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent des avantages importants, liés notamment à leur très haute efficacité 35 d'infection des cellules nerveuses, permettant de réaliser des infections à partir de

faibles volumes de suspension virale. De plus, l'infection par les adénovirus de l'invention est très localisée au site d'injection, ce qui évite les risques de diffusion aux cellules voisines.

En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

- 10 Figure 1 : Représentation du vecteur pONT-tk
Figure 2 : Représentation du vecteur pRSV-tk

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

25 Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

30 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du

fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1. Construction du vecteur Ad-ONT-tk portant le gène tk sous le contrôle d'un promoteur chimère EBNA1-RE/TP1 (figure 1).

Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant comprenant le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (tk) sous le contrôle d'un promoteur spécifiquement actif dans les cellules infectées par le virus EBV (promoteur chimère EBNA1-RE/TP1).

1.1. Construction du plasmide p7tk1

Cet exemple décrit la construction du plasmide p7tk1 contenant la phase ouverte de lecture du gène tk de 1131 paires de bases (ATG 114-116 et codon stop TGA 1242-1244), insérée dans un multisite de clonage.

Le fragment BgIII-NcoI contenant le gène de la thymidine kinase (tk) du virus herpès simplex type 1 a été isolé à partir du plasmide pHSV-106 (commercialisé par Gibco BRL), réparé par l'action du fragment klenow puis inséré au site SmaI du plasmide pGEM7zf(+) (commercialisé par Promega). Les sites SmaI et BgIII sont détruits lors de cette étape, le site NcoI est conservé.

Le plasmide obtenu a été désigné p7tk1.

1.2. Construction du plasmide pONT1

Cet exemple décrit la construction d'un plasmide contenant un promoteur chimère constitué d'une séquence nécessaire à la transactivation par l'antigène EBNA1 et du promoteur TP1 du virus EBV.

5 Le fragment EcoRI(7315)-SmaI(8191) du virus EBV a été isolé à partir de la souche B95-8. La séquence complète du virus EBV a été décrite par Baer et al. (Nature 310 (1984) 207). Ce fragment contient les séquences nécessaires à la transactivation par l'antigène nucléaire 1 (EBNA1) (D. Reisman & B. Sugden, 1986, Molecular and Cellular Biology, vol. 6 pp. 3838-3846). Ce fragment a ensuite été fusionné au fragment NruI(166 241)-PstI(166 559) de l'EBV B95-8 (le site PstI a été digéré par la polymérase T4), contenant le promoteur TP1. Le promoteur chimère
10 ainsi obtenu a ensuite été inséré dans le multisite de clonage du plasmide pBluescript II SK.

Le plasmide obtenu a été désigné pONT1.

15 1.3. Construction du plasmide pONTtk

Le plasmide pONTtk comporte le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (tk) cloné dans le plasmide p7tk1, sous le contrôle du promoteur chimère EBNA1-RE/TP1 cloné dans le plasmide pONT1.

Pour construire ce plasmide, le fragment BamHI-XhoI de pONT1 qui
20 contient le promoteur chimère transactivé par EBNA-1 et EBNA-2, et le fragment XhoI-ClaI de p7tk1 qui contient la phase ouverte de lecture de tk ont été clonés aux sites BamHI (478) et ClaI (4550) du plasmide pAd.RSV β gal. Le plasmide pAd.RSV β Gal contient, dans l'orientation 5'→3',

25 - le fragment PvuII correspondant à l'extrémité gauche de l'adénovirus Ad5 comprenant : la séquence ITR, l'origine de réplication, les signaux d'encapsidation et l'amplificateur E1A;

- le gène codant pour la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV (du virus du sarcome de Rous),

30 - un second fragment du génome de l'adénovirus Ad5, qui permet la recombinaison homologue entre le plasmide pAd.RSV β Gal et l'adénovirus d1324. Le plasmide pAd.RSV β Gal a été décrit par Stratford-Perricaudet et al. (J. Clin. Invest. 90 (1992) 626).

Tous les sites de clonage sont conservés. Le plasmide obtenu a été désigné pONTtk (figure 1).

1.4. Construction de l'adénovirus recombinant Ad-ONT-tk

Le vecteur pONTtk a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

5 Plus précisément, l'adénovirus Ad-ONT-tk a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pONTtk, selon le protocole suivant : le plasmide pONTtk, linéarisé par XmnI, et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la
10 recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

15 Les particules virales sont généralement purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-ONT-tk peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

Exemple 2. Construction du vecteur Ad-RSV-TK

20 Cet exemple décrit la construction d'un adénovirus recombinant comprenant le gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex (tk) sous le contrôle du promoteur RSV. Cet adénovirus a été construit par recombinaison homologue entre l'adénovirus défectif Ad-dl1324 et le plasmide pRSVtk portant le gène tk sous contrôle du promoteur RSV.

25 2.1. Construction du plasmide pRSVtk

Ce plasmide a été construit à partir du plasmide pONTtk (exemple 1.3.), par substitution du promoteur transactivable par EBNA1 par le promoteur RSV. Pour cela, le promoteur RSV a été isolé sous forme d'un fragment BamHI-SalI à partir du plasmide pAd.RSV. β gal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626),
30 puis cloné aux sites BamHI(478) et SalI(1700) du plasmide pONTtk. Le plasmide résultant a été désigné pRSVtk (figure 2).

2.2. Construction de l'adénovirus Ad-RSV-tk

Cet adénovirus a été construit selon le protocole décrit dans l'exemple 1.4. L'adénovirus Ad-RSV-tk ainsi obtenu peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

5 Exemple 3. Utilisation de l'adénovirus Ad-RSV-tk pour la destruction de cellules nerveuses tumorales

L'adénovirus Ad-RSV-tk a été utilisé pour infecter une lignée de cellules tumorales nerveuses (cellules C6 : gliome de rat accessible à l'ATCC sous le numéro ATCC CCL 107). L'infection a été réalisée à un titre de 10 pfu/cellule environ. 24
10 heures après l'infection, les cellules sont traitées en présence de 10^{-5} M de gancyclovir et le taux de mortalité est déterminé 48 heures après. Les résultats obtenus montrent que 100 % des cellules infectées avec l'adénovirus Ad-RSV-tk meurent au bout de 48 heures, alors que, les cellules non infectées ou infectées dans les mêmes conditions avec l'adénovirus Ad-RSV. β gal survivent. Ces résultats montrent bien que l'adénovirus
15 Ad-RSV-tk a rendu les cellules du gliome sensibles au gancyclovir.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour la thymidine kinase sous le contrôle de signaux d'expression hétérologues.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des
5 régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.
3. Adénovirus selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 5 ou canin de type CAV-2.
4. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la
10 séquence d'ADN hétérologue code pour la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex.
5. Adénovirus selon la revendication 4 caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue code pour la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex humain.
6. Adénovirus selon la revendication 5 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux.
- 15 7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et RSV.
8. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend un signal d'expression actif spécifiquement dans les cellules tumorales.
9. Adénovirus selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il comprend un
20 signal d'expression inductible par le virus d'Epstein-Barr (EBV), ou par le virus du papillome.
10. Adénovirus selon la revendication 9 caractérisé en ce que le signal d'expression comprend une séquence répondant à l'antigène EBNA1.
11. Adénovirus selon la revendication 10 caractérisé en ce que le signal
25 d'expression est constitué d'un promoteur chimère comprenant une séquence répondant à EBNA1 fusionnée en amont d'un autre promoteur viral, de préférence le promoteur du gène de la terminale protéine 1 (TP1).

12. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN hétérologue codant pour la thymidine kinase sous le contrôle du promoteur RSV.

13. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN hétérologue codant pour la thymidine kinase sous le contrôle du promoteur EBNA1-RE/TP1.

14. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 13 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des cancers.

15. Utilisation selon la revendication 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des cancers du nasopharynx, des tumeurs cérébrales (neuroblastomes, glioblastomes) ou des hépatocarcinomes.

16. Utilisation selon la revendication 14 ou 15 pour la préparation d'une composition pharmaceutique en vue d'une administration directe dans la tumeur à traiter.

17. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 13.

18. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.

20. 19. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

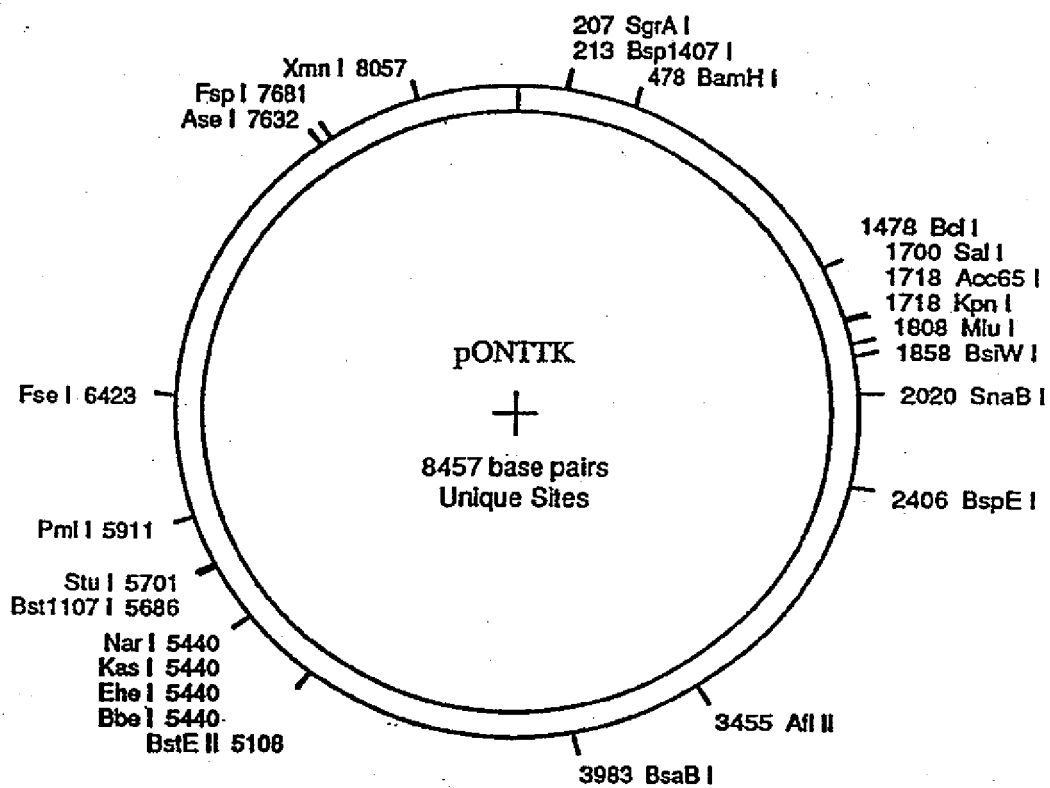


FIGURE 1

2/2

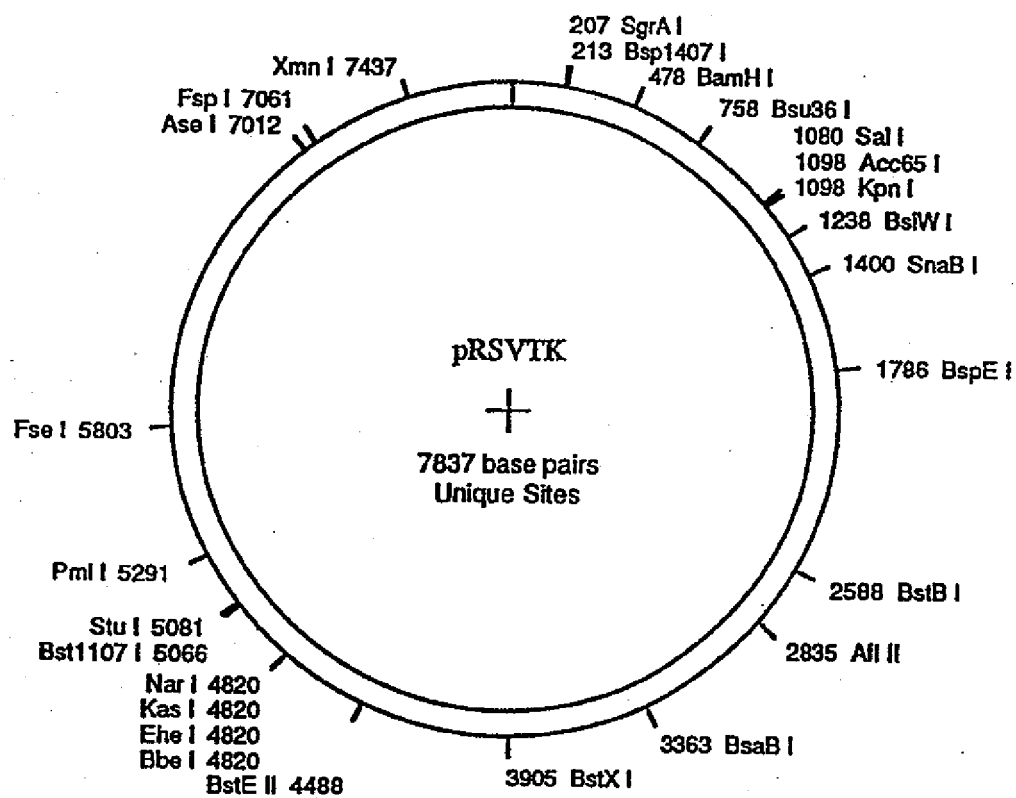


FIGURE 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 94/01285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/85 C12N7/04 A61K39/235

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.87, November 1990, WASHINGTON US pages 8746 - 8750 VENKATESH, L.K. ET AL. 'Selective induction of toxicity to human cells expressing human immunodeficiency virus type 1 tat by a conditionnally cytotoxic adenovirus vector' see the whole document ----- -/-	1-6,17



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 1995

Date of mailing of the international search report

03. 03. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2230 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/FR 94/01285

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF VIROLOGY, vol.57, no.1, January 1986 pages 267 - 274 HAJ-AHMAD, Y. & GRAHAM, F.L. 'Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase gene' see page 272, line 2, last paragraph ---	1-4
P,X	JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol.21, no.SUP1, 1994 page S10 ARBUTHNOT, P.B. ET AL. 'Targeted gene transfer by adenoviral and retroviral vectors in hepatocellular carcinoma cells' see the whole document & 29th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver Athènes, Grèce. 7 to 10 september 1994 ----	1
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.91, no.8, 12 April 1994, WASHINGTON US pages 3054 - 3057 CHEN, S.-H., ET AL. 'Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo' see the whole document ----	1-7
P,X	JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol.39, no.4, 1 November 1994 pages 506 - 511 PEREZ-CRUET, M.J. ET AL. 'Adenovirus mediated gene therapy of experimental gliomas' see the whole document ----	1-7
P,X	CANCER RESEARCH, vol.54, no.20, 15 October 1994 pages 5258 - 5261 OSAKI, T. ET AL. 'Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase' see the whole document ----	1
2 Y	WO,A,93 19191 (CNRS INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 30 September 1993 see the whole document ----	1-8, 14-18

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 94/01285

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 415 731 (WELLCOME FOUNDATION LTD) 6 March 1991 see the whole document ----	1-8, 14-18
Y	WO,A,92 05262 (JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 2 April 1992 see the whole document -----	1-7, 14-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/FR 94/01285

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9319191	30-09-93	FR-A- 2688514	17-09-93
		AU-B- 3757093	21-10-93
		CA-A- 2102302	17-09-93
		EP-A- 0593755	27-04-94
		HU-A- 66486	28-11-94
		JP-T- 6508039	14-09-94
		NO-A- 934061	09-11-93
EP-A-0415731	06-03-91	AU-B- 647747	31-03-94
		AU-A- 6199190	07-03-91
		AU-B- 6458794	08-09-94
		CN-A- 1050899	24-04-91
		JP-A- 3172189	25-07-91
WO-A-9205262	02-04-92	AU-A- 8764391	15-04-92
		CA-A- 2091346	15-03-92
		EP-A- 0551401	21-07-93
		JP-T- 6501161	10-02-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No.
PCT/FR 94/01285

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/85 C12N7/04 A61K39/235		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.87, Novembre 1990, WASHINGTON US pages 8746 - 8750 VENKATESH, L.K. ET AL. 'Selective induction of toxicity to human cells expressing human immunodeficiency virus type 1 tat by a conditionnally cytotoxic adenovirus vector' voir le document en entier <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">-/--</div>	1-6,17
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">21 Février 1995</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">03. 03. 95</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Chambonnet, F</div>

C.(note) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF VIROLOGY, vol.57, no.1, Janvier 1986 pages 267 - 274 HAJ-AHMAD, Y. & GRAHAM, F.L. 'Development of a helper-independent human adenovirus vector and its use in the transfer of the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase gene' voir page 272, ligne 2, dernier alinéa ----	1-4
P,X	JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol.21, no.SUP1, 1994 page S10 ARBUTHNOT, P.B. ET AL. 'Targeted gene transfer by adenoviral and retroviral vectors in hepatocellular carcinoma cells' voir le document en entier & 29th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver Athènes, Grèce. 7 au 10 Septembre 1994 ----	1
P,X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.91, no.8, 12 Avril 1994, WASHINGTON US pages 3054 - 3057 CHEN, S.-H., ET AL. 'Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo' voir le document en entier ----	1-7
P,X	JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol.39, no.4, 1 Novembre 1994 pages 506 - 511 PEREZ-CRUET, M.J. ET AL. 'Adenovirus mediated gene therapy of experimental gliomas' voir le document en entier ----	1-7
P,X	CANCER RESEARCH, vol.54, no.20, 15 Octobre 1994 pages 5258 - 5261 OSAKI, T. ET AL. 'Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase' voir le document en entier ----	1
2 Y	WO,A,93 19191 (CNRS INSTITUT GUSTAVE ROUSSY) 30 Septembre 1993 voir le document en entier ----	1-8, 14-18

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No.

PCT/FR 94/01285

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 415 731 (WELLCOME FOUNDATION LTD) 6 Mars 1991 voir le document en entier ---	1-8, 14-18
Y	WO,A,92 05262 (JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 2 Avril 1992 voir le document en entier -----	1-7, 14-18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux mentions de familles de brevets

Demande Internationale No.

PCT/FR 94/01285

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9319191	30-09-93	FR-A- 2688514	17-09-93
		AU-B- 3757093	21-10-93
		CA-A- 2102302	17-09-93
		EP-A- 0593755	27-04-94
		HU-A- 66486	28-11-94
		JP-T- 6508039	14-09-94
		NO-A- 934061	09-11-93
EP-A-0415731	06-03-91	AU-B- 647747	31-03-94
		AU-A- 6199190	07-03-91
		AU-B- 6458794	08-09-94
		CN-A- 1050899	24-04-91
		JP-A- 3172189	25-07-91
WO-A-9205262	02-04-92	AU-A- 8764391	15-04-92
		CA-A- 2091346	15-03-92
		EP-A- 0551401	21-07-93
		JP-T- 6501161	10-02-94